

Tesis de Licenciatura

Primera evidencia de un RNA ribosomal partido en mamíferos : Caracterización del rRNA 28S de los roedores del género *Ctenomys*

Melen, Gustavo Javier

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Melen, Gustavo Javier. (1997). Primera evidencia de un RNA ribosomal partido en mamíferos : Caracterización del rRNA 28S de los roedores del género *Ctenomys*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000519_Melen

Cita tipo Chicago:

Melen, Gustavo Javier. "Primera evidencia de un RNA ribosomal partido en mamíferos : Caracterización del rRNA 28S de los roedores del género *Ctenomys*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000519_Melen

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PRIMERA EVIDENCIA DE UN RNA RIBOSOMAL
PARTIDO EN MAMÍFEROS:**

**CARACTERIZACIÓN DEL rRNA 28S DE LOS ROEDORES DEL
GÉNERO *Ctenomys***

Gustavo Javier Melen

Director: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

INGEBI - CONICET

1997



519

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	14
RESULTADOS	
1. Preparación de RNA total.....	17
2. Integridad de los RNAs.....	17
3. Caracterización de los fragmentos de rRNA.....	18
4. Mapeo grueso del sitio de clivaje.....	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
BIBLIOGRAFÍA	33

Muchas veces me imaginé el momento en que iba a estar sentado frente a la compu escribiendo precisamente esta página del seminario, "tengo que poner esto y aquello, no olvidarme de agradecerle a fulanito y fulanita", pensaba...pero ahora es realmente difícil, y tantas cosas me pasan por la cabeza que voy a tratar de ordenarlas un poco y no olvidarme de nadie.

Primero a ARK: no tengo palabras...nada alcanza para agradecerte la oportunidad que me diste al aceptarme en el "FN group". Con vos no hay momento, incluyendo los lunes a la mañana, en que no aprenda algo nuevo, desde una idea brillante hasta una palabra nueva (...y de esas que nunca volveré a escuchar), admiro el gusto que te da el hacer ciencia y las ganas que ponés al hacerlo.

Al "FN group":

A Gus: por tu paciencia, porque los primeros experimentos los hicimos juntos y es inolvidable, por la "entrecasa" del pipeteo, porque el "maniatis" y el "red-book" no alcanzan.

Al Negro: por ser tan "open minded", porque siempre tenés una versión distinta a la común y corriente, por tu estilo y principalmente porque fuera del lab hay muchas cosas para aprender.

A Paulita Cramercita (a veces Hiperpaula o PRR): por las anécdotas de no importa quien, por las criticas cinematográficas, televisivas, radiales, gastronómicas, etc. etc., por la vecindad de mesada y porque siempre me defendés.

A Santi: por las escapadas a "La Siembra", "Burger King", "Bingo Cabildo"(bingo + cena!!!) etc. etc., porque sos un compañero de aquellos.

A Susi (WACA WACA para la farándula): por los tucos, por las discusiones con Gus y el Negro que me divierten tanto, porque la biología no lo es todo, por tu hablar medio canshengue.

A Omar: (= coso@yoda) porque le demostraste a este creído egresado de ORT que le faltaba mucho para saber apenas una parte chiquitita de la biología. Porque como a mí, te encantan los chismes.

A los R: Juano, Marce, Vero (Screams & Shouts), Tom y Demián, porque son geniales y porque no vamos a tener más vecinos como ustedes.

Al resto del INGEBI:

A Mirtha y al Doc por permitirme hacer uso y abuso de las instalaciones del instituto.

A la Tere, que es una madre.

A Fer, siempre el consejo justo y el mate listo.

A los chicos (y no tan chicos) de los otros grupos: "los papas": Gaby C, Ken, Bar, Flor, Luciana, Pablo R, Pablito, Xim, Silvia; y Gus; "los ciclasas": Marisa, Andrea, Cris, Albertito, Claudio, Guille, Juaco y Dani; "los kinasas": Eli, Gus, Marcelita y Paula; "los del exilio": Dan, Martín, Inés, Claudia, Eve, Hernán, Sergio y Pablo; A Adolfo y a Paula.

A Ale Colman, que es como del Ingebi.

A la gente que nos ayuda todos los días: Mari, Leonor, Tito (micro + asado + locro), Irma, Marta, Claudio y Mariano.

A Norberto: sos algo más que un bar de ruta!!!

A los chicos de la facu:

A Guada: de qué estas hecha flaca? Sos de fierro, te quiero mucho.

A Diego: amigo de esos que no se encuentran. Gracias por degrocar a Liotta!, que haríamos sin vos?

A Ari: como Diego, casi único.

A Ramiro: por ese viaje que es inolvidable y no habrá otro igual.

A Umbra: por tu sensibilidad y las metidas de pata.

A Isa: por tu "buen humor" siempre presente a la hora del arduo estudio.

A Pato: como si hubieras terminado con nosotros.

AL resto de la gente con la que compartí largas e interminables horas de cursada y estudio (léase horas en el bar de la facu y reuniones sociales):

Anto, Kari B, Kari del point, Charles, Marianín y Fede.

A Guille Lanuza: en especial por las charlas inmensamente ricas en chismes del mundillo científico del que somos parte, a pesar nuestro.

A algunos docentes, que a pesar de la mediocridad que nos envuelve en la bendita FCEyN, tratan día a día de superarla y superarse:

A Daniel Goldstein, Silvia Moreno, Lino Barañao y Esteban Hasson.

A mis amigos del Cole y de siempre:

Al Grupo de los 7: Pablo, Fer, Dani, Germán, Javier y Ale. Más cerca, más lejos, pero siempre ahí.

A Gabi Medina: "que hacés Gabi?". Toda una vida juntos.

A Caro, especialísima.

Finalmente a mis viejos y mi hermano: no hace falta que les diga nada, pero sin ustedes hoy no estaría acá.

A todos MUCHAS GRACIAS de corazón!!!

Gustavo
13 de enero de 1997

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Sobre la maduración del rRNA

Los genes del RNA ribosomal (rRNA) aparecen a lo largo del genoma nuclear eucariótico en múltiples copias organizadas en tándem, separadas entre sí por espaciadores no transcritos (NTS). Cada unidad repetitiva consta de tres genes de rRNA (18S, 5,8S y 28S), separados por dos espaciadores

transcritos internos (ITS) y por uno externo (ETS) a cada lado. Tanto los ITS como los ETS son segmentos presentes en el rRNA precursor que son removidos durante el proceso de maduración que se lleva a cabo en el nucléolo. A diferencia de lo que ocurre en la eliminación de los intrones durante el *splicing*, la escisión de los espaciadores transcritos no es seguida por la unión covalente de los segmentos restantes (Figura 1).

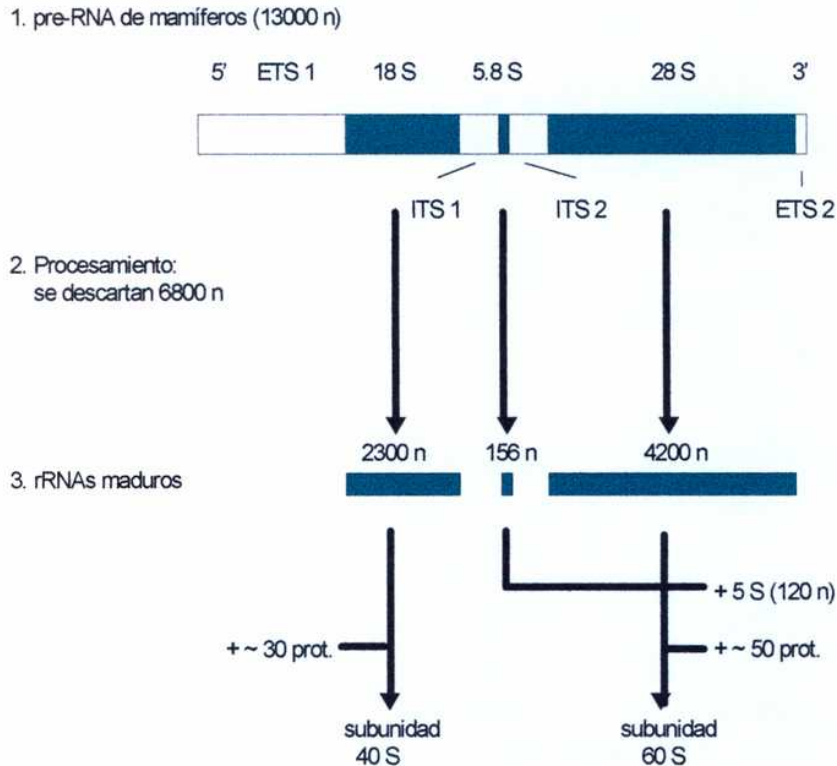


Fig. 1: MADURACIÓN DEL rRNA

2. Sobre la organización del rRNA: segmentos de expansión y cortes ocultos

Numerosos estudios evolutivos de la secuencia de los genes ribosomales han demostrado que cada gen de rRNA está organizado en varios segmentos altamente conservados ("cores") interrumpidos por dominios divergentes, también llamados "segmentos de expansión" (Clark et al., 1984) o "dominios D" (Hassouna et al., 1984) (Figura 2). Los segmentos de expansión

evolucionan rápidamente, con tasas de sustitución que son al menos dos órdenes de magnitud mayores que aquellas que presentan los *cores* conservados. Además, y a diferencia de éstos últimos, los segmentos de expansión muestran una alta tasa de eventos de inserción y deleción (Hassouna et al., 1984; Olsen y Woese, 1993), los cuales causan la gran variación en el tamaño observada en el rRNA de la subunidad mayor de varios organismos (Laudien Gonzalez et al., 1985).

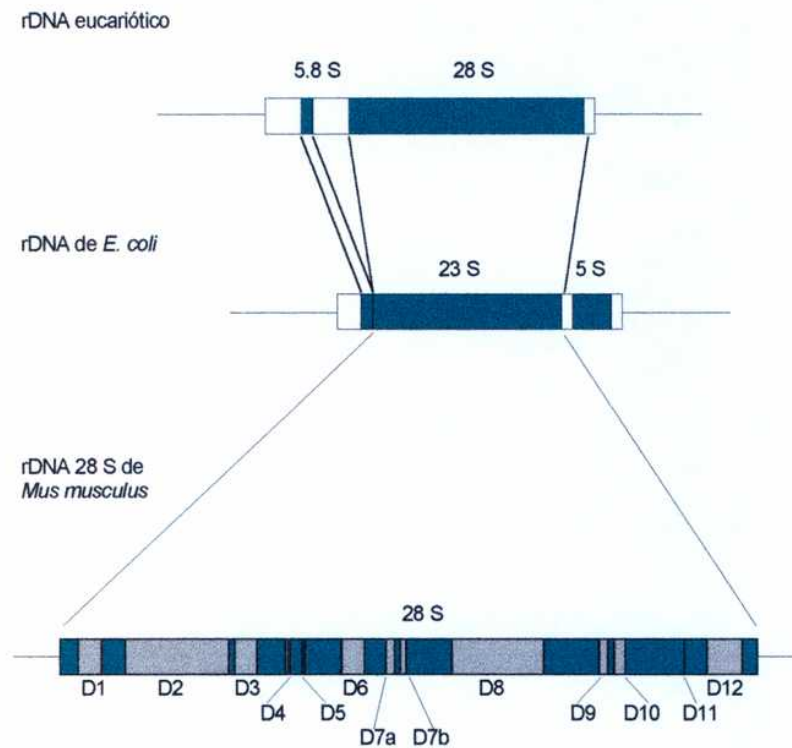


Fig. 2: COMPARACIÓN ENTRE LOS rDNAs EUCARIÓTICOS Y DE *E. coli*
 D1 a D12 (en gris): segmentos de expansión. En verde-azul: regiones conservadas evolutivamente ("cores").

De hecho, la longitud estos rRNAs va desde 2900 nucleótidos en los procariotas (23 S) hasta 3392 nucleótidos en levaduras y 5025 nucleótidos en el humanos (28 S). La rápida evolución de estos segmentos de expansión está bien ilustrada por la considerable variación observada al comparar sus secuencias entre especies evolutivamente cercanas como ratón y rata (Hassouna et al., 1984; Chan et al., 1983; Hadjiolov et al., 1984), y humano y chimpancé (Laudien Gonzalez et al., 1985). Los segmentos de expansión del rRNA de la subunidad mayor de los ribosomas se localizan en la misma posición en todos los eucariotas estudiados, y en vertebrados comparten con los espaciadores transcritos la característica del alto contenido en G+C y bajo contenido en A, lo que les permite adoptar estructuras de doble hélice propias. Contrariamente, los invertebrados muestran segmentos de expansión ricos en A+T.

La importancia fundamental del rRNA en la síntesis de proteínas impone una limitación evolutiva a su estructura global (Fig. 3). La inserción de secuencias que alteren su estructura dentro de los segmentos de expansión que evolucionan rápidamente tendría un valor adaptativo negativo a menos que estuviera acompañada por mecanismos que eliminen los fragmentos insertados del rRNA maduro, similar a lo que ocurre con la escisión de los espaciadores transcritos. Si esta escisión, no seguida por religado, ocurriera en una región que no deba ser necesariamente continua para ser funcional, daría por resultado un rRNA "fragmentado". Los rRNAs fragmentados han sido descritos en procariotas (*Salmonella typhimurium*, Burgin et al., 1990) y en muchos grupos de los eucariotas más antiguos que van desde los protozoos (*Tetrahymena*

pyriformis, Eckert et al., 1978; *Acanthamoeba castellani*, Stevens y Pachler, 1972; *Trypanosoma cruzi*, Castro et al., 1981; Hernandez et al., 1983; *Chritidia fasciculata*, Spencer et al., 1987; *Euglena gracilis*, Rawson et al., 1971) hasta gusanos (*Schistosoma mansoni*, van Keulen et al., 1991; *Trichinella spiralis*, Zarlenga y Dame, 1992) y artrópodos (*Bombyx mori*, Applebaum et al., 1966; *Aedes aegypti*, Shine y Dalgarno, 1973; *Musca carnaria*, Lava-Sanchez y Puppo, 1975; *Drosophila*, Jordan et al., 1976; *Sciara coprophila*, Ware et al., 1985; *Galleria mellonella*, Ishikawa y Newburgh, 1972). El rRNA mitocondrial en *Chlamidomonas reinhardtii* (Boer y Gray, 1988) y el cloroplástico en las plantas superiores (Fujiwara e Ishikawa, 1986) también están fragmentados.

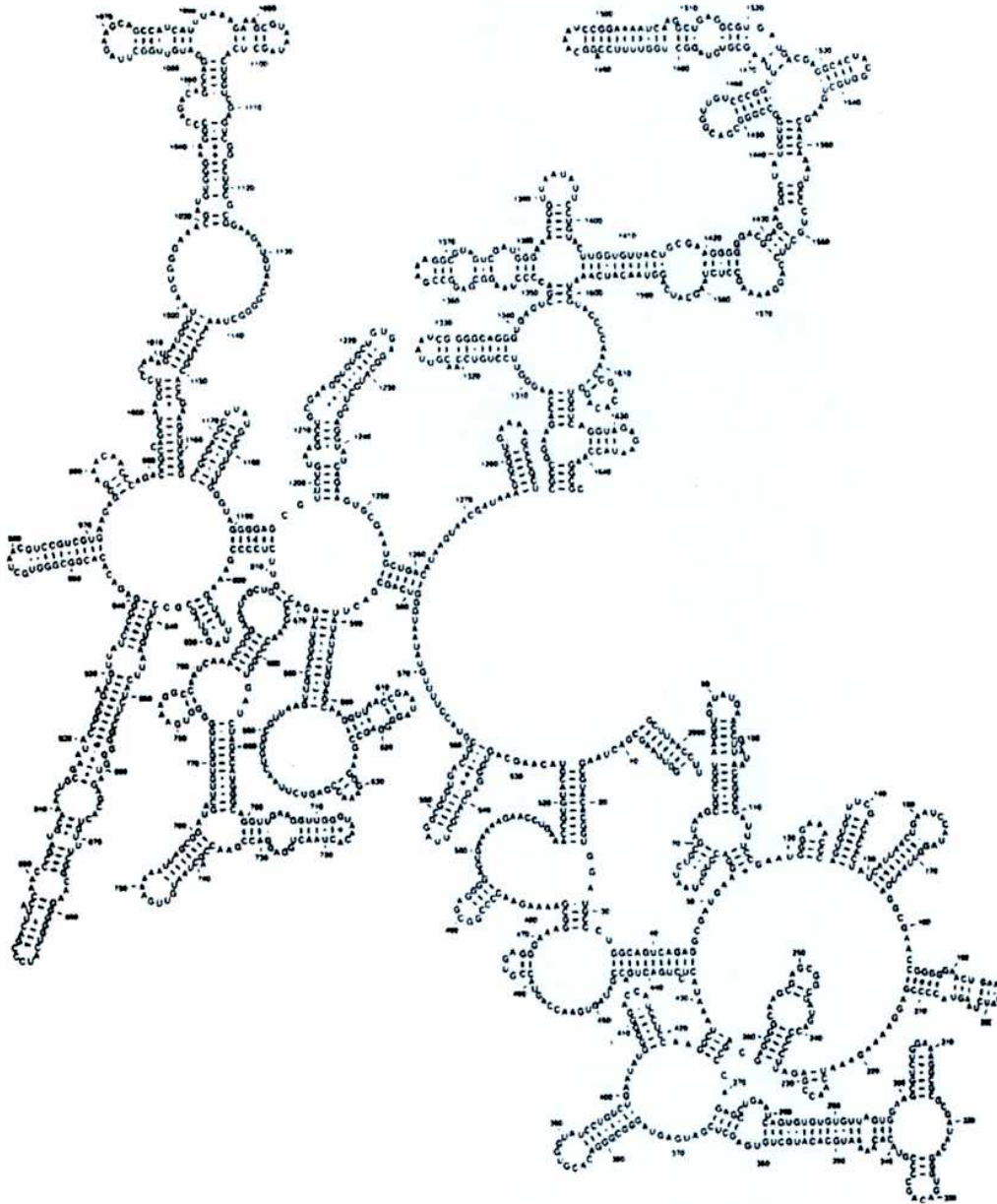
Mientras que en condiciones nativas los rRNAs fragmentados muestran un comportamiento electroforético idéntico a aquellos no fragmentados, en condiciones desnaturalizantes los "cortes ocultos" se evidencian por la aparición de bandas de rRNA de menor peso molecular que el esperado. Un caso extremo de fragmentación es el que se observa en el rRNA de la subunidad mayor de los ribosomas de los tripanosomátidos, en los cuales existen seis especies de rRNA que unidas corresponderían al rRNA intacto de otros organismos (Spencer et al., 1987).

Se ha asumido que los rRNAs en los deuterostomados no están fragmentados (Fujiwara e Ishikawa, 1986). Esta conclusión está probablemente tomada sobre la base de que las pocas especies de deuterostomados usadas en investigación en biología molecular (*Xenopus*, pollo, rata, ratón, cobayo,

hamster, conejo, perro, vaca, cerdo, cabra, mono, simio, humano, etc.) constituyen una muestra selecta y no representativa de animales de

laboratorio y granja y las investigaciones de las especies en vida salvaje son escasas.

A



E. coli

3. sobre el modelo utilizado en esta Tesis de Licenciatura

Los roedores sudamericanos del género *Ctenomys* ("tuco-tucos") son los más numerosos en especies entre todos los roedores. La figura 4 muestra su ubicación taxonómica. Una radiación intragenérica explosiva tuvo lugar durante el Pleistoceno y condujo a la aparición de aproximadamente 56 especies vivientes (Reig et al., 1990).

Clase: Mamalia
 Subclase: Theria
 Infraclase: Eutheria
 Orden: Rodentia
 Infraorden: Caviomorpha
 Superfamilia: Octodontoidea
 Familia: Octodontidae
 Subfamilia: Octodontinae
 Género: **Octodontomys**
 Subfamilia: Ctenomynae
 Género: **Ctenomys**
 Infraorden: Miomorpha
 Familia: Muridae
 Subfamilia: Murinae
 Géneros: **Mus**
Rattus

Fig. 4: Ubicación taxonómica del género *Ctenomys* (Reig, 1986) y otros géneros mencionados en esta Tesis de Licenciatura.

Las distintas especies del género difieren ampliamente en sus características cariotípicas, incluyendo el tipo y número de zonas heterocromáticas.

El análisis de secuencias repetitivas dentro del género mostró la existencia de una secuencia repetitiva mayoritaria, agrupada en tándem. Este satélite, denominado Secuencia Repetida PvuII de *Ctenomys*, SRPC, representa en algunas especies como *C. australis* y *C. porteusi*, el 10% del DNA celular total. En contraste, *C. opimus* no presenta cantidades detectables.

La secuencia del monómero de dicho tándem, de 348 pb, presenta una considerable identidad con la región U3 del LTR ("long terminal repeat") del virus del sarcoma de Rous. Esta región contiene elementos que regulan la transcripción y replicación del genoma viral, algunos de los cuales se encuentran en la SRPC (Rossi et al., 1990; Rossi et al., 1993; Pesce et al., 1994).

Al investigar si alguna/s copia/s del satélite era/n transcripta/s en células de hígado de *Ctenomys*, inesperadamente se encontró en nuestro laboratorio que el rRNA presentaba un patrón anómalo en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se observaron dos bandas de 2.6 Kb y 1.8 Kb, donde la de mayor movilidad doblaba en intensidad a la de menor movilidad. En su lugar debería haberse observado el patrón típico de los rRNAs de mamíferos compuesto por dos bandas de 4.4 Kb y 1.8 Kb donde la primera es al menos el doble de intensa que la segunda,

Surgieron dos posibles explicaciones para este fenómeno. La posibilidad de un rRNA 28 S más corto que el de rata o

ratón no explicaba la relación de intensidades observada entre ambas bandas en la corrida electroforética en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Por otro lado, la posibilidad de un rRNA 28 S clivado, tal lo que ocurre en la gran mayoría de los protostomados (Fujikawa e Ishikawa, 1986). En este caso el patrón anómalo se explicaría pensando en una molécula de rRNA 28 S cuyo clivaje no sería advertido en electroforesis en geles de agarosa en condiciones nativas, mientras que sí se evidenciaría en electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes y se obtendrían dos moléculas, una de 2.6 Kb y la otra 1.8 Kb.

Esto significaría que la molécula de mayor movilidad debería comigrar con el rRNA 18 S (también de 1.8 Kb) y por lo tanto la relación de intensidades en la tinción con bromuro de etidio debería invertirse respecto al patrón esperado para el RNA de rata o ratón.

Esta observación podría deberse también a un simple artificio técnico o constituirse en una novedad sin precedentes en biología molecular estructural con posibles connotaciones evolutivas y funcionales.

Los resultados que se muestran en esta Tesis de Licenciatura constituyen la primera evidencia convincente de rRNAs fragmentados en vertebrados.

Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo central de esta Tesis de Licenciatura es interpretar el patrón anómalo de electroforesis del rRNA de *Ctenomys* y comprobar que se trata de un rRNA 28 S fragmentado, descartando artificios técnicos y caracterizando aproximadamente el sitio de clivaje.

Para cumplir con este objetivo se realizaron los siguientes experimentos:

1. Prueba del método de purificación de RNA

Para descartar que el clivaje del RNA de 28 S de *Ctenomys* fuera consecuencia de un artefacto producido durante la preparación de RNA total de tejido, se preparó conjuntamente RNA total de distintos órganos de *Ctenomys* y de rata.

2. Comprobación de la integridad de los RNAs

Con el objeto de asegurar que durante el manipuleo de los RNAs no se produce alteración alguna de los mismos, se hicieron ensayos de Northern Blot utilizando como sondas cDNAs contra mRNAs de alto y bajo peso molecular.

3. Caracterización de los fragmentos del rRNA 28 S

La demostración definitiva de que los fragmentos observados provienen de la molécula de rRNA 28 S se llevó a cabo mediante gradientes de sacarosa para separar los RNAs ribosomales en condiciones nativas y luego analizar su comportamiento en geles

desnaturalizantes. Como control se usó rRNA de distintos tejidos de rata o ratón.

4. Mapeo grueso del sitio de clivaje

Se hicieron Northern blots usando como sondas distintos fragmentos de DNA ribosomal de ratón marcadas radioactivamente con el fin de realizar un mapeo grueso de la región donde probablemente se encuentra el sitio de corte.

Resultados

RESULTADOS

1. Preparación de RNA total

Con el objeto de demostrar que el patrón anómalo observado en la electroforesis en geles de agarosa no se debía a un artificio técnico se preparó RNA total de hígado de *Rattus norvegicus* (rata) y de *Ctenomys talarum*. Por otra parte, se homogeneizaron conjuntamente cantidades iguales de ambos tipos de hígado y se preparó RNA total. Las tres preparaciones fueron realizadas por el método en el cual se homogeneiza el tejido en isotiocianato de guanidinio y se somete luego a una extracción con fenol ácido (Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987).

La figura 5 muestra los resultados obtenidos luego de someter alícuotas de las preparaciones a una electroforesis en gel de agarosa desnaturizante.

La preparación de RNA de *Ctenomys* se sembró en la calle 1, la correspondiente a la mezcla de hígados en la calle 2 y a la de rata en la número 3.

El RNA de rata muestra las bandas características del 28 S (4400 nt) y del 18 S (1800 nt). Contrariamente, el RNA de *Ctenomys* muestra un banda de 2600 nt y otra de 1800 nt. En la preparación conjunta se observa la superposición de ambos patrones electroforéticos.

Como controles se utilizaron dos métodos alternativos para la preparación del RNA (resultados no mostrados). El método descrito por Strohmman et al. (1977) se basa en la homogeneización en cloruro de guanidinio y precipitaciones diferenciales con etanol 33% (v/v), mientras que en el método modificado de Favaloro et al. (1980) se homogeneiza en un detergente no iónico suave y se continua con la sedimentación de los núcleos y la

extracción fenólica del sobrenadante. Ambos métodos alternativos dieron resultados similares al de Chomczynski indicando que el patrón anómalo no es consecuencia de una degradación debida al tipo de procedimiento utilizado en la preparación del RNA.



Fig. 5: Electroforesis en gel de agarosa desnaturizante teñido con bromuro de etidio.

2. Integridad de los RNAs

Para confirmar que ninguno de los RNAs presentes en las preparaciones sufre alteración alguna durante la preparación de RNA, se realizaron ensayos de Northern blot con sondas que reconocieran mRNAs de alto y bajo peso molecular.

Se sembraron muestras de RNA total de *Rattus norvegicus* y de *Ctenomys talarum* en geles desnaturizantes, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con sondas de cDNA de fibronectina y gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (GPDH) marcadas con ^{32}P por el método de "random priming". La figura 6 muestra los resultados obtenidos: se observan bandas claras y nítidas correspondientes a un mRNA de alto (fibronectina) y otro de bajo (GPDH) peso molecular, señalando la calidad de las mismas y la ausencia de hidrólisis generalizada en las muestras.

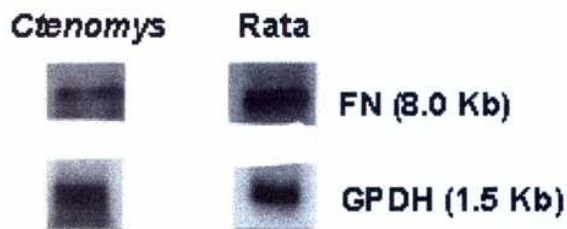


Fig. 6: Northern blot, autorradiografía.

3. Caracterización de los fragmentos de rRNAs 28 S

Para demostrar que las moléculas de 2.6 y 1.8 Kb provienen del rRNA 28 S fragmentado *in vivo*, separamos el rRNAs 28 S del 18 S mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa del 10 al 30 % (p/v) en condiciones nativas.

Alícuotas de las fracciones que contienen a los rRNA de 28 y 18 S fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa desnaturizantes.

En la figura 7 se observa la electroforesis en gel de agarosa nativo de alícuotas de las fracciones eluidas del gradiente de sacarosa tanto de *Ctenomys* como de rata. Las fracciones

fueron numeradas desde el fondo hacia el tope.

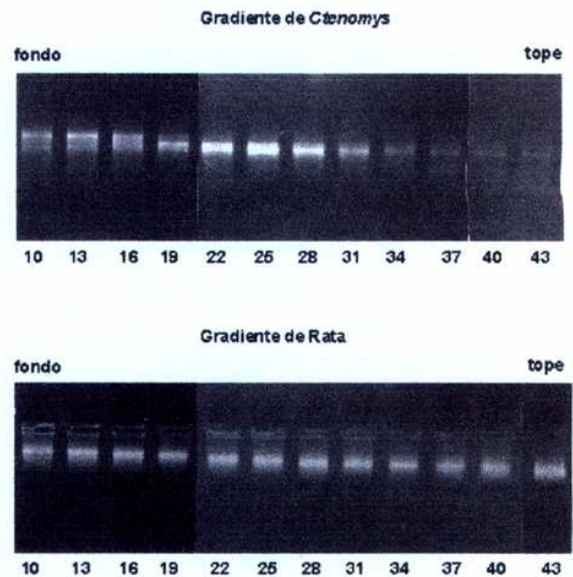


Fig. 7: Electroforesis en gel de agarosa nativo teñido con bromuro de etidio de distintas alícuotas de ambos gradientes.

Las fracciones #10 (que contienen el rRNA 28 S) y alícuotas de las preparaciones crudas fueron desnaturizadas por tratamiento en un buffer con formaldehído y formamida y sometidas a electroforesis en gel desnaturizante. El resultado se muestra en la figura 8B.

En el panel A de esta misma figura se incluyen también a las fracciones #10 y #28 sometidas a electroforesis en gel de agarosa nativo.

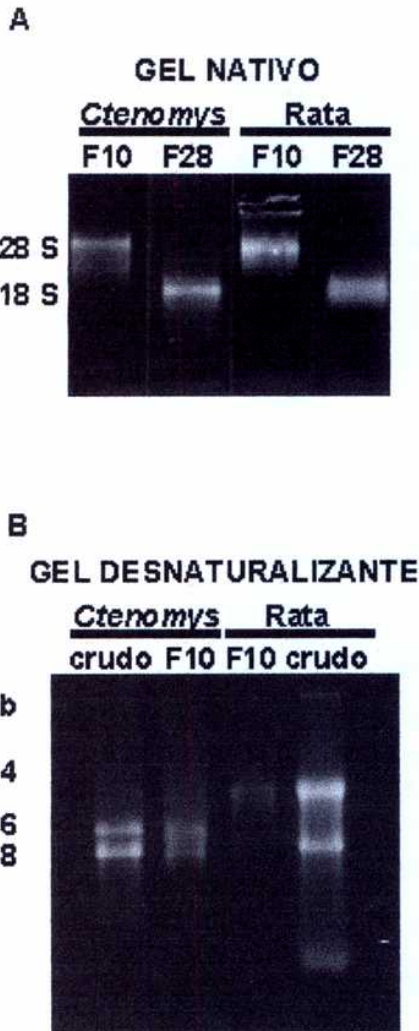


Fig. 8: Panel A: electroforesis en gel de agarosa nativo teñido con bromuro de etidio de las fracciones #10 y #28 de ambos gradientes. Panel B: electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante teñido con bromuro de etidio de las fracciones #10 de ambos gradientes y de muestras crudas de ambas preparaciones.

Estos resultados evidencian que en condiciones nativas existe un rRNA de 4.4 kb en la preparación de *Ctenomys*, el rRNA 28 S, que luego del tratamiento que lo desnaturaliza revela dos

fragmentos de 2.6 y 1.8 nt. El RNA de rata utilizado como control no altera su integridad luego de la desnaturalización.

4. Mapeo grueso del sitio de clivaje

En base al tamaño de los fragmentos 5' y 3' observados (figura 5 y resultados previos) se preparó una sonda a partir del clon genómico de rDNA de ratón pMR100 (Grummt, 1982) que incluyera las secuencias del gen del rRNA 28 S entre los sitios para las enzimas de restricción Nco I y Bgl II (ver figura 10) y se marcó por *fill in*. Al utilizar esta sonda en un Northern blot se observa en rata hibridación con el rRNA de 4.4 kb y, en *Ctenomys talarum*, con ambos rRNAs de 2.6 y 1.8 kb (figura 9).

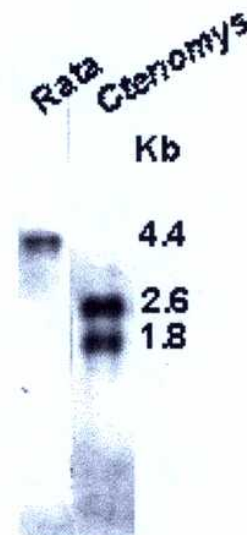


Fig. 9: Northern blot utilizando el fragmento NcoI-BglIII como sonda.

Esto indica que el sitio de clivaje se halla incluido en la región del rRNA de 28 S

de *Ctenomys* homóloga a la de ratón utilizada como sonda.

Sabiendo que el sitio de clivaje se encontraba dentro del fragmento de 323 pb utilizado como sonda, se prepararon distintos subfragmentos a partir de éste y se los utilizó como sondas en nuevos ensayos de Northern Blot con RNA de rata y de *Ctenomys talarum*. Estas sondas fueron marcadas por *fill in* o por la polinucleótido kinasa del fago T4, dependiendo del sitio de restricción que le dio origen, y siempre eluidas de un gel de poliacrilamida.

Todos los fragmentos hibridan con el RNA ribosomal de 28 S de rata. En *Ctenomys talarum* dos subfragmentos del extremo 5' del fragmento de 323 pb. (Nco I - Hae III y Hae II - Not I, en rojo en la figura 10) hibridan sólo con la banda de 1.8 kb, lo cual indica que este fragmento corresponde al extremo 5' del rRNA. Dos subfragmentos del extremo 3' (Ava I - BssH II y Msp I, en azul en la figura 10) hibridan sólo con la banda de 2.6 kb, lo que señala que esta banda representa al extremo 3' del rRNA de 28 S. Sin embargo, un subfragmento central (Not I - Apa I, rojo/azul en la figura 10) hibrida con ambas bandas, indicando que el sitio de clivaje está incluido en su secuencia.

Dado que las secuencias de los subfragmentos se solapan parcialmente, la ubicación del sitio de clivaje queda acotada a unos 20 nt., señalados con naranja en la figura 10 sobre la estructura secundaria del rRNA de 28 S. De todas maneras, no podemos descartar definitivamente la posibilidad de que el sitio se encuentre fuera de estas 20 bases, pero dentro del fragmento Not I - Apa I.

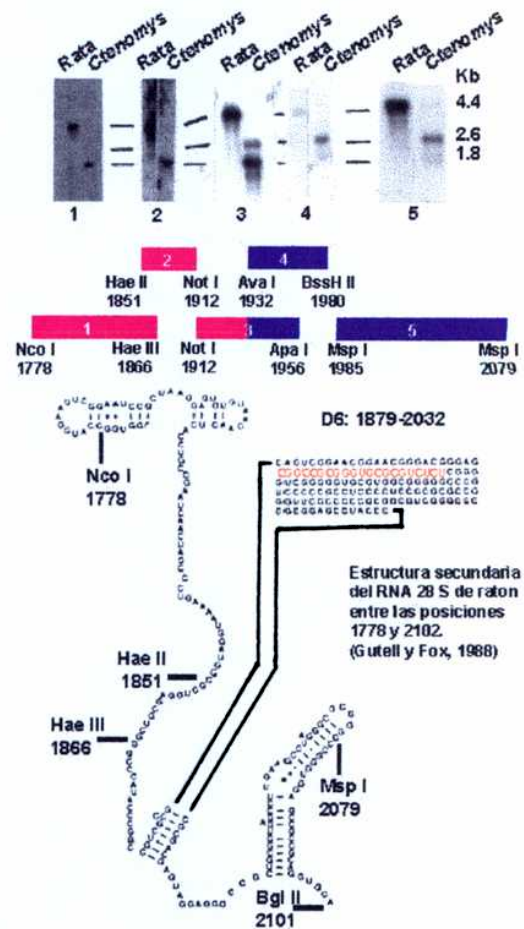


Fig. 10: Northern blot con los 5 subfragmentos utilizados como sondas y su posición sobre la estructura secundaria del rRNA 28 S de ratón. Solo se señalan las enzimas de restricción cuyos sitios se encuentran fuera de la región divergente D6.

Discusión

DISCUSIÓN

Surge de la figura 5 que los protocolos empleados para la preparación de RNA total no introduce modificación alguna en el comportamiento electroforético de las moléculas.

Es decir que el fragmento de 2.6 kb que aparece en la preparación de *Ctenomys* existe *in vivo* y no es producto de la manipulación a la que es sometido el órgano previamente o durante la preparación del RNA.

La transferencia de estos RNAs y la hibridación contra sondas de cDNAs para detectar mRNAs de alto y bajo peso molecular no hace más que confirmar que las muestras no sufren una hidrólisis generalizada, y que por lo tanto los RNAs obtenidos se encuentran en perfecto estado, tal y cual se encontraban en el ambiente celular del cual fueron extraídos (figura 5).

Resultados previos mostraban que el fragmento de 2.6 kb correspondía a la región 3' de la molécula del rRNA 28 S. En ensayos de northern blot, muestras de RNAs de distintas especies de *Ctenomys* y de células de la granulosa bovina usadas como control fueron enfrentadas contra sondas para el 28 S y 18 S y para regiones 5'y 3' del rRNA 28 S humano. Se comprobó entonces que el RNA 28 S se descomponía en 2 moléculas de distinto peso molecular: una de aproximadamente 2.6 kb y la otra comigrante con el RNA 18 S.

La sonda contra el rRNA 18 S solo mostró la banda de 1.8 kb.

Cuando se utilizaron las sondas para las regiones 5' y 3' encontramos que la fracción de 2.6 kb hibridaba con la primera mientras que la comigrante con la 18 S lo hacía con la segunda.

Para comprobar definitivamente que los fragmentos provenían del rRNA 28 S separamos ambos rRNAs por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa en condiciones nativas. Al correr alícuotas en electroforesis en geles de agarosa nativos comprobamos que el perfil del gradiente de *Ctenomys* era exactamente igual al de rata. Esta observación confirmaba que existían en la preparación de *Ctenomys*, alícuotas que contenían RNAs del mismo tamaño que el correspondiente al rRNA 28 S de rata.

Tras someter a electroforesis desnaturalizante a las fracciones #10, correspondientes al rRNA 28 S, demostramos que dicho rRNA 28 S de *Ctenomys* se descompone en los fragmentos de 2.6 y 1.8 kb, lo que no ocurre con el rRNA de rata (figuras 7 y 8).

Basándonos en los resultados previos ubicamos los 2 fragmentos sobre la secuencia publicada para el RNA 28 S de ratón (Hassouna et al. 1984) y encontramos que la separación entre ambos residía en el "loop D" o el "D6", según la nomenclatura empleada. Esta localización resulta coherente ya que es esperable que un clivaje diferencial respecto del resto de los rRNAs de los vertebrados descritos hasta el presente mapee dentro de una zona de divergencia y no dentro de un segmento conservado de la molécula de 28 S.

Finalmente para poner a prueba esta hipótesis preparamos los subfragmentos mostrados en la figuras 9 y 10 a partir del clon pMR100 que contiene el rDNA 28 S de ratón. Partimos de un subfragmento de 323 pb (Nco I - Bgl II) que contiene todo el D6.

Este hibridó con ambas bandas (2.6 y 1.8 kb) indicando que efectivamente el

sitio de clivaje se encontraba codificado en su interior.

Luego a partir de fragmentos mas acotados llegamos a mapear el sitio preciso dentro de un segmento de 20 nt contenido en la sonda Not I - Apa I.

Como ya se mencionó en la introducción de esta Tesis de Licenciatura, aunque los rRNAs partidos han sido identificados en bacterias, protozoos, helmintos y varios artrópodos, se ha asumido que los rRNAs de los deuterostomados (equinodermos y cordados) no están fragmentados (Fujiwara e Ishikawa, 1986). De hecho, encontramos un único trabajo que describía la existencia de "cortes ocultos" en los rRNAs de un grupo de vertebrados: ciprínidos tetraploides (carpas) (leipoldt y Engel, 1983). Sin embargo, la múltiple fragmentación reportada en ambos rRNAs (28 y 18 S) de estos peces (más de 12 fragmentos pueden verse tras las electroforesis en geles desnaturalizantes) y la falta de controles apropiados no descartan procesos de degradación inespecífica. En cualquier caso, aunque la existencia de "cortes ocultos" en vertebrados sea controversial, no tiene precedentes en mamíferos.

Más allá de los experimentos realizados cabe ahora pensar en las posibles implicancias de nuestro hallazgo, las cuales involucran distintos aspectos que tratan de echar luz sobre la funcionalidad del clivaje:

1. Alteración o no de la actividad del ribosoma: La preparación de RNA total de distintos órganos de *Ctenomys* rinde el 100 % de las moléculas de rRNA 28 S clivadas (resultados no mostrados) lo cual indicaría que esta alteración en la

continuidad de dicha molécula no afecta la actividad ribosomal normal.

De hecho en la literatura se describe una gran cantidad de grupos de los eucariotas más antiguos, insectos y otros invertebrados, que presentan este tipo de modificaciones a la estructura típica (descrita para el rRNA 23 S de *Escherichia coli*) de sus moléculas de rRNA 26S, y se ha llegado a la conclusión que la nueva estructura típica de los rRNAs 26 S de todos los protostomados, presenta una disrupción en su continuidad en algún punto de la molécula (en algunos organismos pueden existir más de un punto de disrupción) concluyéndose por ende, que todas estas moléculas deben ser normalmente activas (Fujikawa e Ishikawa, 1986).

2. La aparición de la disrupción obliga a pensar en mecanismos que sólo pueden operar de dos formas: simplemente se rompe una unión fosfodiéster que divide a la molécula en dos, o bien se escinde un segmento de RNA por ruptura de 2 uniones fosfodiéster. Todavía no tenemos ninguna prueba que nos incline a pensar en una u otra alternativa.

En la literatura se citan ambos mecanismos para la introducción de los "hidden breaks" en los protostomados (Fujiwara e Ishikawa, 1986; Lava-Sanchez y Puppo, 1975; van Keulen et al., 1991; Ware et al., 1985; Zarlenga et al., 1992).

Si lo que ciertamente ocurre es la escisión de un fragmento de RNA, podría tratarse de un espaciador transcripto nocivo para la funcionalidad del ribosoma, cuya eliminación es requerida para que el ribosoma funcione. De ser así, este hallazgo sería de gran importancia, puesto que sería el primer caso reportado en mamíferos.

3. Pueden manejarse distintas alternativas en cuanto al mecanismo que introduce el clivaje. Éstas incluyen la de una nucleasa específica, la cual requeriría la presencia de un sitio de reconocimiento, posiblemente secuencial pero tal vez estructural (Elela et al., 1996).

Una vez clonado y secuenciado el rDNA que da origen a la zona donde se encuentra el clivaje, y luego de realizar un mapeo con nucleasa S1 tendremos su localización exacta y la confirmación de la forma en que opera su introducción (respondiéndose así, al punto anterior). Con estos resultados se buscará en distintos bancos de datos la presencia de secuencias reconocibles por nucleasas, ya descritas, en lo que significa el primer paso hacia la dilucidación del mecanismo de introducción de dicho clivaje.

Si existe una nucleasa específica involucrada en la maduración del rRNA 28 S de estos roedores, puede ocurrir que todavía no esté descrita para ningún organismo como así tampoco su secuencia de reconocimiento, con lo cual la experimentación tomaría un rumbo nuevo y totalmente distinto al que lleva hoy en día, orientado a su búsqueda.

No descartamos la posibilidad de que el corte aparezca como consecuencia de un simple proceso mecánico inducido por la exposición de algún dominio estructural susceptible.

4. En cuanto a las posibles implicancias evolutivas que puede tener nuestro hallazgo podemos decir que el clivaje aparece en todas las especies probadas del género *Ctenomys*: *C. australis*, *C. opimus*, *C. porteusi* y *C. opimus*; como así también en especies del género *Octodontomys* (resultados no

mostrados). Ambos géneros pertenecen a subfamilias distintas, *Ctenomyinae* y *Octodontinae* respectivamente (Reig, 1986) por lo cual es lícito pensar que el clivaje podría ser una característica común de toda la familia *Octodontidae*.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Del análisis de todos los experimentos realizados surge que:

1. El rRNA de 28 S de *Ctenomys* se encuentra clivado en dos fragmentos de 2.6 y 1.8 Kb; hecho inédito, hasta el presente, en mamíferos. En electroforesis en geles de agarosa en condiciones nativas el clivaje pasa inadvertido, pero se evidencia cuando se lo somete a electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.
2. Este clivaje existe *in vivo*, ya que no es un artificio del procedimiento de extracción y purificación del RNA. Los mRNAs ensayados se encuentran en condiciones optimas luego del manipuleo.
3. El mapeo grueso del sitio de clivaje determina que el punto en que éste se produce está contenido dentro de un segmento de 20 nt que se localiza dentro del segmento de expansión D6 de la molécula de rRNA de 28 S.

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

Precaución

Todo material y toda solución que entre en contacto con el tejido o con la preparación posterior de RNA debe estar perfectamente estéril o al menos garantizar el estado de "libre de RNAsas".

Para ello todo material de vidrio es sometido a dos rondas de esterilización en autoclave. Las soluciones que así lo permiten son tratadas con 0.2 ml de DEPC cada 100 ml y junto a las que no lo permiten, también son autoclavadas. Además se trata en lo posible de utilizar todo el material descartable disponible.

Especímenes

Con la excepción de las ratas de laboratorio, todos los especímenes fueron capturados en estado salvaje con trampas que garantizaran el buen estado del animal hasta su sacrificio. El lugar de la captura de *C. talarum* fue Necochea, Buenos Aires.

Preparación de RNA

Todos los RNAs utilizados fueron preparados siguiendo el siguiente protocolo.

Método del "Single-Step RNA Isolation From Cultures Cells or Tissues" (Chomczynski & Sacchi, 1991):

1. Se extraen los órganos de interés de un animal recientemente sacrificado, e inmediatamente son congelados a -70°C .
2. Los tejidos congelados son pulverizados con N_2 líquido. Se parte de 1 gr de cada órgano elegido.
3. Se agrega 1 ml de solución desnaturante por cada 100 mg de tejido y se homogeneiza en homogeneizador del tipo Ultra-Turrax.
4. Se agrega por cada ml de solución desnaturante 0.1 ml de NaAcO 2M pH 4.0, 1 ml de fenol saturado en agua y se mezcla por inversión. Luego se agrega (también por cada ml de solución) 0.2 ml CHCl_3 :isoamílico 49:1 y se mezcla vigorosamente.
5. Se incuba en hielo 15 minutos.
6. Se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a 9000 rpm (aprox. 10000 g).
7. Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo (esta fase contiene el RNA).
8. Se agrega un volumen de isopropanol.
9. Se incuba a -20°C 30 minutos.
10. Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 9000 rpm.

Si la fuente del RNA es rica en glucógeno (por ej. hígado) se disgrega el pellet en 2 - 3 ml de LiCl 4M utilizando un agitador del tipo Vortex. Este paso permite que el glucógeno se disuelva mientras que el RNA permanece precipitado. Luego se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C .

11. Se resuspende el RNA en 300 μ l de solución desnaturalizante por cada 100 mg de tejido original.
12. Se agrega 1 volumen de isopropanol.
13. Se incuba a -20°C 30 minutos.
14. Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 9000 rpm.
15. Se resuspende el pellet en etanol 75% (v/v).
16. Se deja a temperatura ambiente 10 - 15 minutos.
17. Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 9000 rpm.
18. Se seca el pellet aplicando vacío.
19. Se resuspende en 100 - 200 μ l de H_2O y se agregan 3 volúmenes de etanol absoluto.
20. Se almacena a -70°C .

Soluciones utilizadas

Solución Desnaturalizante:

Tiocianato de Guanidinio	4 M
Citrato de Sodio pH 7	25 mM
2-Mercaptoetanol	0.1 M
N-laurilsarcósido	0.5% (p/v)

Gradientes de sacarosa

Se utilizó un gradiente continuo de sacarosa que va desde 10 hasta 30% (p/v) creciendo hacia el fondo del tubo. Para ello se procedió de la siguiente manera:

1. Se preparan soluciones de sacarosa al 10 y 30% (p/v) en buffer TE 1X.
2. Se mezclan ambas para lograr soluciones al 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14 y 12% (p/v)

3. Con los tubos de ultracentrífuga a utilizar colocados en hielo, se procede a armar el gradiente, partiendo de la solución al 30%, tomando 370 μ l de cada capa con una pipeta pasteur y depositando lentamente su contenido contra las paredes de dichos tubos. Se utilizan tubos de 4.5 ml (rotor Sorball SW 55).
4. Se deposita de la misma manera la última capa: el RNA en TE 1X. Se utilizan 120 μ g de RNA total de testículo de rata y de hígado de *Ctenomys*. Se sella el tubo y se lo deja en hielo hasta el momento de la centrifugación.
5. Se centrifuga a 4°C durante 13 horas a 24000 rpm.
6. Los fracciones del gradiente se colectan introduciendo una cánula hasta el fondo del tubo, y conectando dicha cánula a una bomba peristáltica. Se obtienen 60 fracciones de aprox. 75 μ l. cada una.

Soluciones utilizadas

Buffer TE 1X:

Tris·Cl	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Electroforesis de RNA

I. Geles de agarosa nativos

A. Preparación del gel:

Se prepara un gel de agarosa 1% (p/v) en buffer TBE 1X. Se le agrega 1 μ l de bromuro de etidio 1% (p/v) por cada 50 ml de gel.

B. Preparación de las muestras:

A las muestras de RNA se les agrega 1/10 de su volumen de buffer de siembra 10X.

C. Corrida electroforética:

Se realiza en buffer TBE 1X, a 7 V/cm (muy rápidamente) en cuarto frío (4°C) para reducir al máximo posible la degradación del RNA.

II. Geles de agarosa desnaturalizantes

A. Preparación del gel:

El gel de agarosa 1% (p/v) se prepara en buffer MOPS 1X, se estabiliza a 65°C y se le agrega formaldehído 6% (v/v) final.

B. Preparación de las muestras:

1. Las muestras de RNA deben ser desnaturalizadas previamente a la corrida, es por ello que al RNA disuelto en buffer TE 1X (5 µl de la fracción indicada) se le agrega formamida hasta lograr un 50% (v/v), formaldehído hasta un 6% (v/v) y MOPS hasta 1X. Se agrega 1 µl de bromuro de etidio 0.05% (p/v).
2. Se incuban las muestras a 65°C 15 minutos.

C. Corrida electroforética:

Se realiza en buffer MOPS 1X. Se corre a 2 V/cm (muy lentamente) con recircularización del buffer de corrida.

Soluciones utilizadas

Buffer TBE 1X:

Tris·Cl	90 mM
Ácido Bórico	0.55% (p/v)
EDTA pH 8	2 mM

Buffer MOPS 1X:

MOPS pH 7	40 mM
AcONa	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Buffer de siembra 1X

TBE	1X
Glicerol	5% (v/v)
azul de bromofenol	0.04% (p/v)

Northern Blot (Lehrach et al. 1977)

A. Electroforesis desnaturalizante

Se procede de idéntica manera al protocolo descrito anteriormente. Se siembran 10 µg de cada muestra de RNA.

B. Transferencia de los RNAs

1. Se arma el sistema de la figura. Se utiliza una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham).



2. Notar que el gel debe colocarse con los pocillos hacia abajo.

3. Evitar la aparición de burbujas de aire entre las superficies de contacto del gel con el papel Whatman, del gel con la membrana y de esta última con los otros papeles Whatman.
4. Se deja a temperatura ambiente entre 16 a 20 horas.
5. Se desarma cuidadosamente el sistema.
6. Se marca con un lápiz al óleo la posición de los pocillos sobre la membrana de nylon.
7. Para comprobar si la transferencia tubo éxito puede visualizarse el gel a través de un transiluminador de UV, debe observarse que no quedan rastros de ninguna banda.
8. Si la membrana utilizada es de nylon se continua directamente con la prehibridación, en cambio si la membrana es de nitrocelulosa, deben fijarse los RNAs a la misma: se hornea la membrana a 80°C durante 2 horas.

C. Prehibridación e hibridación

1. Se coloca la membrana cara arriba dentro de un tubo de hibridación.
2. Se agregan 5 - 10 ml de solución de prehibridación.
3. Se incuba con agitación a 65°C durante 1 hora.
4. Se agrega la sonda y se continua la incubación con agitación por 16 - 20 horas más.

D. Lavados

1. Se reemplaza la solución que contiene la sonda por buffer SSC 2X y se agita a temperatura

- ambiente 15 minutos. Se repite 1 vez más.
2. Se renueva la solución y se incuba a 65°C durante 15 minutos.
3. Se reemplaza el buffer por SSC 1X y se incuba a 65°C durante 30 minutos.
4. Se continúan los lavados con SSC 0.1X a 65°C durante 30 minutos.
5. Se retira la membrana, se la coloca dentro de un folio plástico y se lo sella.
6. Se expone la membrana a una película autorradiográfica con pantalla intensificadora a -70°C por 16 -20 horas.
7. Se revela la autorradiografía.

Soluciones utilizadas

SSC 20X:

NaCl	3 M
Citrato de sodio	0.3 M

Solución de prehibridación:

SSC	5X
Denhardt's	1X
sssDNA	100 µg/ml
Dodecilsulfato de sodio	0.5% (p/v)

Denhardt's 50X (Denhardt 1966):

Ficoll (tipo 400)	1% (p/v)
Polivinilpirrolidona	1% (p/v)
Albúmina de suero bovino(fracción V)	1% (p/v)

Marcación de sondas

1. Método de marcación por iniciación al azar (RANDOM PRIMING)

Se utilizó un kit de Random Multiprime de Gibco BRL, fragmento Klenow de DNAPol I y α - 32 P-dATP.

Brevemente, 50 ng del DNA a marcar se desnaturalizan por calor y se incuban a temperatura ambiente con una mezcla de hexanucleótidos de secuencias variadas y aleatorias, dATP radioactivo, dGTP, dCTP y dTTP fríos y polimerasa Klenow.

Los productos de marcación fueron separados del radioactivo no incorporado en una columna de sepharosa G25, de la que eluyen primero porque no se incluyen en la resina. El DNA así eluido se agrega a la mezcla de prehibridación.

2. Método de la fosforilación en el extremo 5'

Se incuban 200 ng de DNA (el cual no puede tener extremos 3' protruyentes) en 20 μ l de solución del buffer comercial de la enzima 1X con 1 μ l de γ - 32 P-ATP 50 μ Ci/ μ l y 10U de la enzima polinucleótido kinasa (PNK) del fago T4 a 37°C durante 30 minutos.

Los nucleótidos no incorporados se separan por doble precipitación etanólica con NH_4AcO 2.5 M final y 20 μ g de sssDNA como carrier.

En caso de que el extremo a marcar sea como el protocolo comienza con una incubación del DNA a 70°C durante 10 minutos para aumentar la eficiencia de la incorporación.

3. Método del relleno (FILL IN)

Cuando el DNA a utilizarse como sonda proviene de una restricción que deja extremos 5' protruyentes se

lo puede marcar radioactivamente incubando 200 ng en 20 μ l de una solución del buffer comercial de la enzima 1X con 1 μ l de α - 32 P-dATP o α - 32 P-dCTP 100 μ Ci/ μ l y 10U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I a temperatura ambiente durante 15 minutos. La elección del nucleótido radioactivo se realiza en función de cual es el primer nucleótido desapareado que deja la enzima de restricción utilizada.

Luego se agrega 2 μ l de una mezcla de los 4 dNTPs fríos (CHASE) 2.5 mM y se continua la incubación por otros 10 minutos.

Los nucleótidos no incorporados se eliminan de la misma forma que en la marcación con la PNK del fago T4.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Citada:

- Applebaum, S.W., Ebstein, R.P. & Wyatt, G.R. (1966) Dissociation of ribonucleic acid from silkworm pupae by heat and dimethylsulfoxide: evidence for specific cleavage points. *J. Mol. Biol.* 21, 29-41.
- Boer, P.H. & Gray, M.W. (1988) Scrambled ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *Cell* 55, 399-411.
- Burgin, A.B., Parodos, K., Lane, D.J. & Pace, R. (1990) The excision of intervening sequences from *Salmonella* 23 S ribosomal RNA. *Cell* 60, 405-414.
- Castro, C., Hernandez, R. & Castaneda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219-233.
- Chan, Y.L., Olvera, J. & Wool, I.G. (1983) The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 7819-7831.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clark, C.G., Tague, B.W., Ware, V.C. & Gerbi, S.A. (1984) *Xenopus laevis* 28 S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Res.* 12, 6197-6220.
- Eckert, W.A., Kaffenberger, W., Krohne, G. & Franke, W.W. (1978) Introduction of Hidden Breaks during rRNA maturation and aging in *Tetrahymena pyriformis*. *Eur. J. Biochem.* 87, 607-616.
- Elela, S.A., Igel, H. & Ares, M Jr. (1996) RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115-124.
- Favaloro, J., Treisman, R. & Kamen, R. (1980) Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods Enzymol.* 65, 718-749.
- Fujiwara, H. & Ishikawa, H. (1986) Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28 S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids. Res.* 14, 6393-6401.
- Gutell, R.R. & Fox, G.E. (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids. Res.* 16, supplement r175-r269.
- Hadjiolov, A.A., Georgiev, G.I., Nosikov, V.V. & Yavachev, L.P. (1984) Primary and secondary structure of rat 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 12, 3677-3693.
- Hassouna, N., Michot, B. & Bachelletre, J.P. (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 12, 3563-3583.
- Hernandez, R., Nava, G. & Castañeda, M. (1983) Small-size ribosomal RNA

- species in *Trypanosoma cruzi*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 8, 297-304.
- Ishikawa, H. & Newburgh, R.W. (1972) Studies of the thermal conversion of 28S RNA of *Galleria mellonella* (L.) to an 18S product. *J. Mol. Biol.* 64, 135-144.
- Jordan, B.R., Jourdan, R. & Jacq, B. (1976) Late steps in the maturation of *Drosophila* 26S ribosomal RNA: generation of 5.8S and 2S RNAs by cleavages occurring in the cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 101, 85-105.
- van Keulen, H., Mertz, P.M., Lo Verde, T., Shi, H. & Rekosh, D.M. (1991) Characterization of a 54-nucleotide gap region in the 28 S rRNA gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem. Parasitol.* 45, 205-214.
- Laudien Gonzalez, I., Gorski, J.L., Campen, T.J., Dorney, D.J., Erickson, J.M., Sylvester, J.E. & Schmickel, R.D. (1985) Variation among human 28S ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 7666-7670.
- Lava-Sanchez, P.A. & Puppo, S. (1975) Occurrence *in vivo* of "Hidden Breaks" at specific sites of 26 S ribosomal RNA of *Musca carnaria*. *J. Mol. Biol.* 95, 9-20.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Leipoldt, M. & Engel, W. (1983) Hidden breaks in ribosomal RNA of phylogenetically tetraploid fish and their possible role in the diploidization process. *Biochemical Genetics* 21, 819-841.
- Olsen, G.J. & Woese, C.R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7, 113-123.
- Pesce, C.G., Rossi, M.S., Muro, A.F., Reig, O.A., Zorzópulos, J. & Kornblihtt, A.R. (1994) Binding of nuclear factors to a satellite DNA of retroviral origin with marked differences in copy number among species of the rodent *Ctenomys*. *Nucleic Acids Res.* 22, 656-661.
- Rawson, J.R., Crouse, E.J. & Stutz, E. (1971) The integrity of the 25S ribosomal RNA from *Euglena gracilis* 87S ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 246, 507-516.
- Reig, O.A., Busch, C., Ortells, M.O. & Contreras, J. (1990) An overview of evolution, systematics, population biology and speciation in *Ctenomys*. En: Nevo E & Reig O.A. (eds.). *Evolutionary Biology of Subterranean Mammals*. Alan R. Liss, NY, pp. 71-96.
- Reig, O.A. (1986) Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. En: Vuilleumier F. & Monasterio M. (eds.). *High Altitude Tropical Biogeography*. Oxford University Press, NY-Oxford, pp. 404-439.
- Rossi, M.S., Reig, O.A. & Zorzópulos, J. (1990) Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol. Biol. Evol.* 7, 340-350.
- Rossi, M.S., Pesce, C.G., Kornblihtt, A.R. & Zorzópulos, J. (1993) Retroviral like-features of the major satellite DNA

of the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *DNA seq.* 3, 379-381.

Shine, J. & Dalgarno, L. (1973) Occurrence of heat-dissociable ribosomal RNA in insects: the presence of three polynucleotide chains in 26 S RNA from cultured *Aedes aegypti* cells. *J. Mol. Biol.* 75, 57-72.

Spencer, D.F., Collings, J.C. & Gray, M.W. (1987) *EMBO J.* 6, 1063-1071.

Stevens, A.R. & Pachler, P.F. (1972) Discontinuity of 26S rRNA in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Mol. Biol.* 66, 225-237.

Strohman, R.C., Moss, P.S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A., & Paterson, B. (1977) Messenger RNA for myosin polypeptides: isolation from single myogenic cell cultures. *Cell* 19, 265-273.

Ware, V.C., Renkawitz, R. & Gerbi, S.A. (1985) rRNA processing: removal of only nineteen bases at the gap between 28S α and 28S β rRNAs in *Sciara coprophila*. *Nucleic Acids Res.* 13, 3581-3597.

Zarlenga, D.S. & Dame, J.B. (1992) The identification and characterization of a break within the large subunit RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 281-290.

2 Consultada:

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. Current protocols in

molecular biology, Kaaren Jansen ed., John Wiley & sons, inc.

Awata, S. & Natori, Y. (1977) Turnover of rat 28S ribosomal RNA. Nicking as the initial step of degradation. *Bioch. Biophys. Acta.* 478, 486-494.

Ayane, M., Preuss, U., Köhler, G. & Nielsen, P.J. (1991) A differentially expressed murine RNA encoding a protein with similarities to two types of nucleic acid binding motifs. *Nucleic Acids Res.* 19, 1273-1278.

Boyd, D., de Vos, T., Klassen, G. & Dick, T. (1989) Characterization of the ribosomal DNA from *Trichinella spiralis*. *Mol. Biol. Parasitol.* 35, 67-92.

De Rjik, P., Van de Peer, Y., Chapelle, S. & De Wachter, R. (1994) Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 3495-3501.

De Rjik, P., Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1996) Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 92-97.

Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. & Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262, 5908-5912.

Endo, Y. & Tsurugi, K. (1987) RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262, 8128-8130.

Gutell, R.R., Schnare, M.N., & Gray, M.W. (1990) A compilation of large subunit (23S-like) ribosomal RNA

sequences presented in a secondary structure format. *Nucleic Acids Res.* 18, supplement 2319-2330.

Gutell, R.R., Gray, M.W. & Schnare, M.N. (1993) A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* 21, 3055-3074.

Hadjiolova, K.V., Georgiev, O.I., Nosikov, V.V. & Hadjiolov, A.A. (1984) Localization and structure of endonuclease cleave sites involved in the processing of the rat 32S precursor to ribosomal RNA. *Biochem. J.* 220, 105-116.

Hancock, J.M. & Dover, G.A. (1988) Molecular coevolution among critically simple expansion segments of eukaryotic 26S/28S rRNAs. *Mol. Biol. Evol.* 5, 377-391.

Hancock, J.M. & Dover, G.A. (1990) 'Compensatory slippage' in the evolution of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 18, 5949-5954.

Hancock, J.M., Tautz, D. & Dover, G.A. (1988) Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5, 393-414.

Houge, G., Robaye, B., Eikhom, T.S., Golstein, J., Mellgren, G., Gjertsen, B.T., Lanotte, M. & Døskeland, S.O. (1995) Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2051-2062.

Joyce, G.F. (1989) RNA evolution and the origin of life. *Nature* 338, 217-224.

Kokileva, L., Mladenova, I. & Tsanev, R. (1971) Differential thermal stability of old and new ribosomal RNA of rat liver. *Febs Lett.* 12, 313-316.

Kooi, E.A., Rutgers, C.A., Mulder, A., Van't Riet, J., Venema, J. & Raué, H.A. (1993) The phylogenetically conserved doublet tertiary interaction in domain III of the large subunit rRNA is crucial for ribosomal protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 213-216.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. & Pace, N.R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6955-6959.

Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J., & Woese, C.R. (1996) The ribosomal database project. (RDP) *Nucleic Acids Res.* 24, 82-85.

Maidak, B.L., Larsen, N., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Olsen, G.J., Fogel, K., Blandy, J. & Woese, C.R. (1994) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22, 3485-3487.

Mougey, E.B., Pape, L.K., Sollner-Webb, B. (1993) A U3 nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol. Cell Biol.* 13, 5990-5998.

Müller, D., Rehbein, M., Baumeister, H. & Richter, D. (1992) Molecular Characterization of a novel rat protein structurally related to poly (A) binding protein and the 70K protein of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle

(snRNP). *Nucleic Acids Res.* 20, 1471-1457.

Nedbal, M.A., Allard, M.W. & Honeycutt, R.L. (1994) Molecular systematics of hystricognath rodents: evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Mol. Phyl. Evol.* 3, 206-220.

Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Saxena, S.K. & Ackerman, E.J. (1990) Ribozymes correctly cleave a model substrate and endogenous RNA *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 265, 17106-17109.

Scheer, U., Thiry, M. & Goessens, G. (1993) Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3, 236-241.

Selenska-Pobell, S. & Evguenieva-Hackenberg, E. (1995) Fragmentations of the large-subunit rRNA in the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 177, 6993-6998.

Springer, N., Ludwig, W., Amann, R., Schmidt, H.J., Görtz, H.D. & Schleifer, K.H. (1993) Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligated bacterial

endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9892-9895.

Shine, J., Hunt, J.A. & Dalgarno, L. (1974) Studies on the 3'-terminal sequences of the large ribosomal ribonucleic acid of different eukaryotes and those associated with 'hidden' breaks in heat-dissociable insect 26S ribonucleic acid. *Biochem. J.* 141, 617-625.

Tautz, D., Hancock, J.M., Webb, D.A., Tautz, C. & Dover, G.A. (1988) Complete sequence of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5, 366-376.

Van de Peer, Y., Van den Broeck, I., De Rjik, P. & De Wachter, R. (1994) Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 3488-3594.

Ware, V.C., Tague, B.W., Clark, C.G., Gourse, R.L., Brand, R.C. & Gerbi, S.A. (1983) Sequence analysis of 28S ribosomal DNA from the amphibian *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids. Res.* 11, 7795-7817.



Gustavo J. MELEN



Dr. Alberto R. KORNBLIHT